



Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral

www.elsevier.es/piro



TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Efecto del ultrasonido endodóntico sobre clorhexidina al 2% en la formación de paracloroanilina. Estudio *in vitro*



Daniela Onetto^a, Verónica Correa^b, Pilar Araya^b, Ismael Yévenes^{c,*} y Miguel Neira^d

^a Cirujano Dentista, Magister en Odontoestomatología, Departamento de Ciencias Odontológicas, Escuela Dental, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile

^b Cirujano Dentista, Especialista en Endodoncia, Departamento de Ciencias Odontológicas, Escuela Dental, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile

^c Químico-Farmacéutico, Profesor Asociado, Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas. Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Santiago, Chile

^d Bioquímico, Profesor Ayudante, Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas. Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Recibido el 23 de julio de 2014; aceptado el 21 de junio de 2015

Disponible en Internet el 21 de agosto de 2015

PALABRAS CLAVE

Clorhexidina;
Espectrofotometría;
Paracloroanilina;
Ultrasonido

Resumen

Introducción: La clorhexidina (CHX) en solución acuosa se hidroliza generando paracloroanilina (PCA), proceso acelerado por el aumento de temperatura y pH. El uso de ultrasonido endodóntico (USE), basado en fenómenos de oscilación, cavitación, microcorriente acústica, genera calor afectando la CHX.

Objetivo: Identificar y cuantificar *in vitro* cambios fisicoquímicos, temperatura y pH, y la cantidad de PCA formada con el uso de ultrasonido endodóntico sobre soluciones de CHX al 2%.

Materiales y métodos: La CHX 2% se activó durante 30, 60, 90 y 120 seg con USE a 24.500 Hz, midiendo antes y después de activación: pH, temperatura y cantidad de PCA, leyendo a 375 nm en curva de calibración de estándares de PCA y formación, registrando el espectro de absorción mediante espectrofotómetro UV-visible.

Resultados: El USE aumentó la temperatura en 1 °C independiente del tiempo de aplicación y acidificó la solución de CHX 2%, sin variaciones significativas en pH y temperatura. No se observó coloración ni formación de precipitado en muestras activadas por USE a los diferentes tiempos. Las muestras no presentaron valores medibles de PCA a 375 nm. Los espectros de absorción de CHX 2% y activadas por USE por más de 60 seg presentaron curvas espectrales, peaks y valores de absorbancia diferentes.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: iyevenes@odontologia.uchile.cl (I. Yévenes).

KEYWORDS

Chlorhexidine;
Spectrophotometry;
p-chloroaniline;
Ultrasound

Conclusiones: El USE aumenta la temperatura y acidifica la solución de la CHX en todos los tiempos de aplicación. No se detectó presencia de PCA por espectrofotometría visible. Muestras activadas por USE por 60 seg o más presentan espectros de absorción diferentes a las muestras sin activar.

Diferencias en los espectros de absorción entre CHX activadas con USE y con CHX sin activar indicarían degradación de la CHX y posible presencia de PCA.

© 2015 Sociedad de Periodoncia de Chile, Sociedad de Implantología Oral de Chile y Sociedad de Prótesis y Rehabilitación Oral de Chile. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Effect of endodontic ultrasound on 2% chlorhexidine in the formation of parachloraniline. *In vitro* study

Abstract

Introduction: Chlorhexidine (CHX) in aqueous solution is hydrolysed to p-chloroaniline (PCA), a process accelerated by increasing temperature and pH. Using endodontic ultrasound based on oscillation phenomena, cavitation, and acoustic microstreaming generates heat, affecting the CHX.

Objective: The aim of this *in vitro* study was to identify and quantify the physical-chemical changes, temperature and pH, and the amount of PCA formed by increasing the temperature of 2% CHX by endodontic ultrasound.

Materials and methods: Samples of 2% CHX were activated for 30, 60, 90, and 120 seconds with endodontic ultrasound 24,500 Hz. The pH and temperature were measured before and after activation, as well as the formation and amount of PCA, by reading and recording the result obtained from a standard calibration curve reading at 375 nm in a UV-visible light spectrophotometer.

Results: Independent of time, ultrasound increased the temperature of 2% CHX by 1 °C and acidified the solution. No significant changes were recorded in pH and temperature. No staining or precipitates were observed in samples ultrasonically activated at different times. Samples read at 375 nm showed no measurable PCA values. Absorption spectra of 2% CHX and 2% CHX activated for more than 60 seconds showed different spectral curves, peaks, and absorbance values.

Conclusions: Ultrasound increased the temperature and acidified the solution of CHX for all application times. No PCA was detected by visible spectrophotometry. Absorption spectra of 2% CHX activated with ultrasound at different times differs from 2% CHX without activation.

These differences indicate degradation of CHX and possible presence of PCA.

© 2015 Sociedad de Periodoncia de Chile, Sociedad de Implantología Oral de Chile y Sociedad de Prótesis y Rehabilitación Oral de Chile. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

El tratamiento endodóntico tiene como objetivo lograr un canal desinfectado y sellado tridimensionalmente para prevenir su contaminación. La compleja anatomía del sistema de canales impide que el tejido orgánico e inorgánico residual, y las bacterias que pudieran estar alojadas en ellos, puedan ser completamente eliminados, por lo que usualmente persisten^{1,2}.

Variadas terapias antimicrobianas se han recomendado para eliminar los microorganismos desde los canales radiculares, incluyendo la instrumentación del canal radicular y el uso de diferentes irrigantes, apósitos intracanales y sellantes coronarios^{3,4}. El éxito del tratamiento antiinfeccioso endodóntico se asocia directamente con el control de microorganismos y la disrupción del biofilm bacteriano⁵. La medicación del canal es la aplicación de un fármaco

en el interior de la cavidad pulpar necesaria para eliminar la infección⁶; es requerida en infecciones crónicas, rebeldes y en tratamientos endodónticos fallidos. La clorhexidina (CHX) se utiliza como medicación intracanal por su sustantividad y por su concentración⁷. La sustantividad antimicrobiana depende del número de moléculas de CHX disponibles para interactuar con la dentina. Por lo tanto, medicar el canal con una preparación CHX más concentrada da lugar a un aumento de la resistencia a la colonización microbiana. La sustantividad antibacteriana a concentraciones diferentes de CHX después de 5 min de aplicación ha sido evaluada. Los resultados revelaron una relación directa entre la concentración de CHX y su sustantividad (Mohammadi et al., 2008)⁷.

La CHX se usa como irrigante endodóntico en concentraciones de 0,2% a 2%⁸⁻¹⁰. Se ha utilizado como agente antiséptico de rutina en el control de la placa dental y la

reducción de la microbiota endodóntica durante la irrigación del canal radicular sin eliminar endotoxinas^{11,12}. La molécula de CHX plantea un riesgo sistémico debido a que, al descomponerse, genera subproductos reactivos tales como para-cloroanilina (PCA)^{9,13}. La PCA es generada por la hidrólisis de CHX en función del tiempo, pH alcalino y calor^{9,10}. Adicionalmente, la presencia de PCA se ha detectado en soluciones de CHX^{9,13}. Basrani et al. han observado que al calentar CHX por encima de 45° Celsius se produce la formación de PCA como subproducto¹⁴. La PCA ha sido clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, 2006) en su grupo 2B, como agente posiblemente cancerígeno para los seres humanos^{14,15}.

En la irrigación activa se integra a la terapia endodóntica el uso del ultrasonido a modo de incrementar la eliminación de detritus y microorganismos, basándose en los fenómenos de oscilación, cavitación, microcorriente acústica que además genera calor¹⁶.

El objetivo de este estudio fue identificar y cuantificar *in vitro* cambios fisicoquímicos, temperatura y pH, y la cantidad de PCA formado con el uso de ultrasonido endodóntico sobre soluciones de CHX al 2%.

Material y método

Consideraciones éticas

Este estudio prospectivo, experimental y explicativo *in vitro* recibió la aprobación del Comité de Ética de Investigación Humana de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Chile), bajo el número de protocolo FIOUCH 13-015.

Materiales

Se empleó 4-cloroanilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO., EE. UU.), solución digluconato de clorhexidina al 20% en H₂O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO., EE. UU.). Todas las soluciones y diluciones usadas en la investigación fueron preparadas en el laboratorio de química de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Tamaño de la muestra

Debido a las mínimas variaciones observadas en las mediciones experimentales intraparámetro (pH, temperatura) se fijó el tamaño de muestra en 10.

Mediciones fisicoquímicas en solución de clorhexidina al 2%

En tubos eppendorf de 1,5ml se colocaron 10 muestras de 1ml de CHX al 2% y se procedió a aplicar ultrasonido endodóntico (USE) con equipo marca MECTRON® Model piezo smart (Mectron s.p.a., Carasco [GE], Italia) a una frecuencia de 24.500Hz con lima #55K de 31mm marca KERR-SYBRONENDO Model K3 (SybronEndo Corporation, 1717 West Collins Orange, CA 92867) por 30, 60, 90 y 120seg. En las muestras se procedió a medir antes y después de USE: pH, temperatura, concentración de PCA y espectrogramas de absorción.

Determinación de pH

Las mediciones de pH antes y después de la aplicación de USE se hicieron con el pHmeter marca WTW, modelo pH 537 (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Alemania) calibrado entre pH 4-11.

Determinación de la temperatura

Se usó un sensor de temperatura marca WTW, modelo TFK 325 (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Alemania) conectado al pHmeter marca WTW.

Determinación de concentración de 4-cloroanilina

Estándares de PCA al 0,039mg/ml, 0,0237mg/ml, 0,0117mg/ml y 0,0039mg/ml se leyeron al máximo de 375nm en espectrofotómetro UV-visible (Thermo Spectronic Unicam UV-530 UV-Visible, Rochester, NY, EE. UU.). Se construyó curva de calibración absorbancia vs concentración de PCA y se determinó concentración de PCA de muestras tratadas con USE leyendo su absorbancia.

Espectrogramas de absorción

Muestras de CHX tratadas con USE y no tratadas y estándares de PCA se les determinó sus espectrogramas de absorción (absorbancia vs longitud onda) de 400 a 600nm en espectrofotómetro UV-visible.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico para ciencias sociales (SPSS para Windows, versión 18.0, SPSS Inc, Chicago, IL, EE. UU.). El análisis descriptivo de las variables se realizó para caracterizar la muestra. Resultados de pH y temperatura antes y después de la aplicación de USE fueron comparados. Se llevaron a cabo los test de Shapiro Wilk y de Levene para determinar la normalidad de la distribución de datos y la homogeneidad de las varianzas. Se utilizó la prueba de «t»-test para comparar ambos grupos. Se adoptó un nivel de significación de 0,05 para todas las pruebas.

Resultados

Después de aplicar USE a una frecuencia de 24.500Hz por 30, 60, 90 y 120seg los valores de pH se acidificaron entre 0,06 y 0,16 unidades de pH, pero sin variaciones significativas entre el antes y el después para todos los tiempos de aplicación (fig. 1). La temperatura se incrementó entre 1,0 y 1,1 °C, pero sin variaciones significativas previo y posterior a la aplicación de USE (fig. 2).

Ecuación de la curva de calibración de 4-cloroanilina

Los estándares de PCA leídos a 375nm permiten obtener la curva de calibración, de ecuación: absorbancia = 1,427

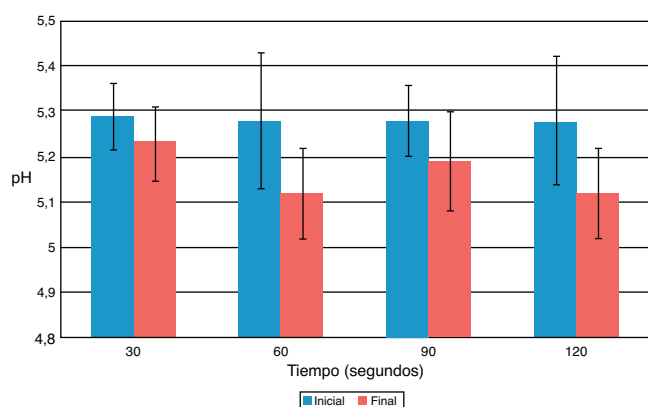


Figura 1 Valores promedios de pH y desviación estándar para clorhexidina 2% sometida a ultrasonido endodóntico (USE) a una frecuencia de 24.500 Hertz. Las diferencias entre el antes y el después para todos los tiempos de aplicación de USE no son significativas.

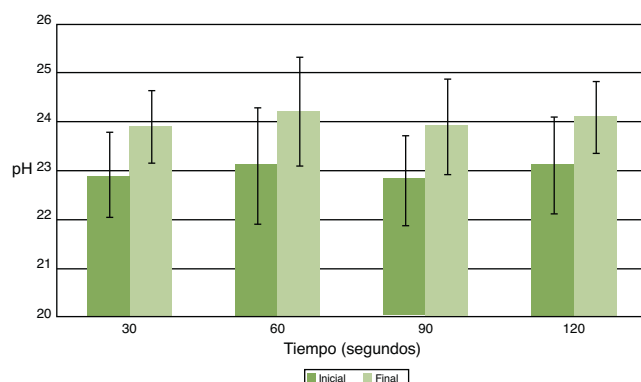


Figura 2 Valores promedios de temperatura y desviación estándar para clorhexidina 2% sometida a ultrasonido endodóntico (USE) a una frecuencia de 24.500 Hertz. Las diferencias entre el antes y el después para todos los tiempos de aplicación de USE no son significativas.

[PCA]-0,040 y con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,999$.

Determinación de p-cloroanilina

Utilizando la ecuación de la curva se transformaron los valores de absorbancia en concentración de PCA. En ninguna de las muestras tratadas con USE a diferentes tiempos se observó coloración. Todos los valores de absorbancia medidos en las muestras tratadas con USE a diferentes tiempos fueron inferiores al valor mínimo de PCA estándar de 0,0039 mg/ml.

Espectrogramas de absorción

Los espectros de absorción de CHX 2% y activadas por USE presentaron curvas espectrales, *peaks* y valores de absorbancia diferentes. Los espectrogramas obtenidos a los diferentes tiempos de aplicación de ultrasonido endodóntico sobre clorhexidina al 2% se visualizan en la [figuras 3–6](#).

Discusión

La generación de PCA es consecuencia de la hidrólisis de la CHX, que se puede conseguir aumentando su temperatura y/o sometiéndola a un pH alcalino¹⁵.

Se evidenció que el pH de las soluciones de CHX activadas por USE presentaron una baja, pero sin variaciones significativas, lo que explicaría la ausencia de PCA coloreado o precipitado. Las soluciones de CHX son estables en el intervalo de pH de 5,0-8,0. Sobre pH 8,0 la clorhexidina precipita, y en condiciones más ácidas se produce un deterioro de la actividad debido a que es menos estable¹⁷. El ultrasonido produjo un aumento de la acidez; esto se explica por el carácter ácido de la CHX, donde un aumento de la temperatura produce una disminución de su pKa, que lleva a una disminución del pH¹⁸.

La generación de calor y aumento de la temperatura son efectos que produce la aplicación de ultrasonido dentro del canal radicular. Esto resulta de la energía liberada durante la cavitación, con implosión de microburbujas de gas o por fricción de la lima oscilatoria con las paredes del canal

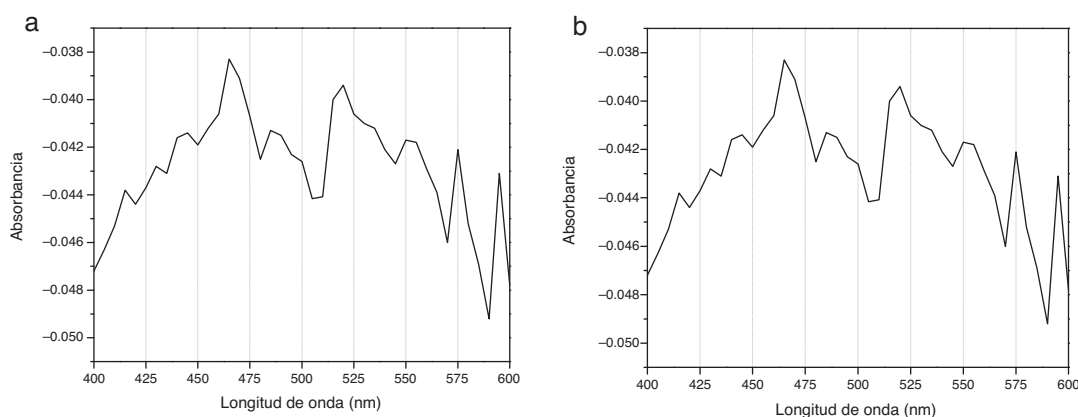


Figura 3 El espectrograma «a» corresponde al espectro de absorción de CHX al 2% no tratada y el espectrograma «b» corresponde al espectro de absorción de CHX al 2% activada con ultrasonido endodóntico por 30 seg.

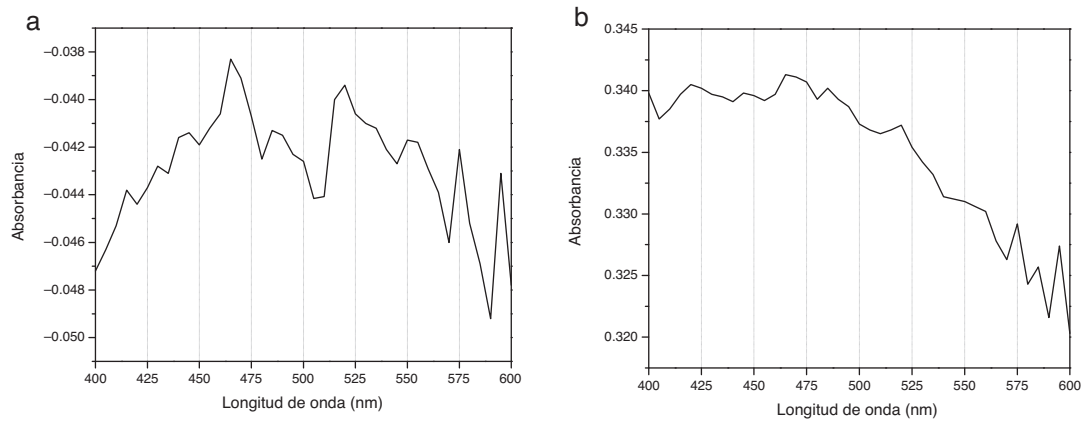


Figura 4 El espectrograma «a» corresponde al espectro de absorción de CHX al 2% no tratada y el espectrograma «b» corresponde al espectro de absorción de CHX al 2% activada con ultrasonido endodántico por 60 seg.

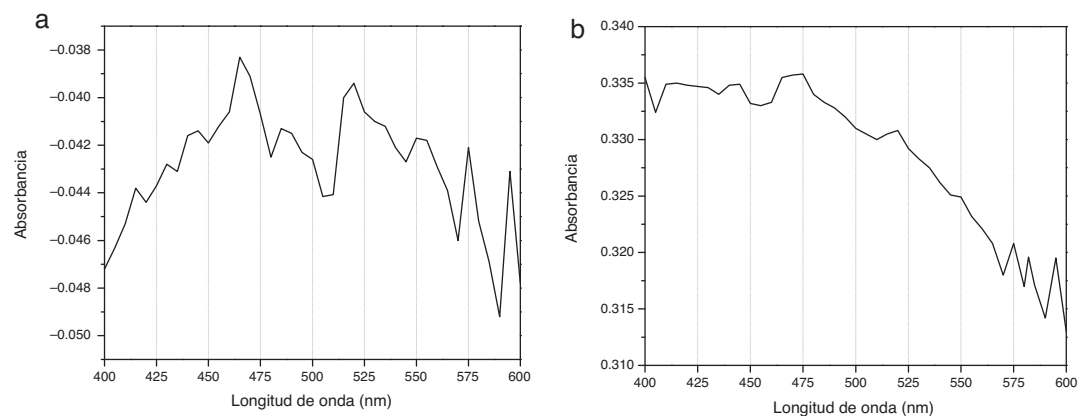


Figura 5 El espectrograma «a» corresponde al espectro de absorción de CHX al 2% no tratada y el espectrograma «b» corresponde al espectro de absorción de CHX al 2% activada con ultrasonido endodántico por 90 seg.

radicular¹⁹. La generación de calor producido por la fricción del instrumento con las paredes potencia el efecto sobre los compuestos orgánicos como hipoclorito de sodio y la clorhexidina, tal como lo proponen Cunningham y Balekjian²⁰, pero que puede producir la formación de microfRACTURAS en la estructura dentinaria debido al calor generado por la

fricción del instrumento y por la instrumentación con una intensidad de energía excesiva. En clínica el volumen de irrigante empleado en canales radiculares está confinado a un espacio reducido e inextensible, dándole a la micro-corriente acústica o circulación del fluido una menor área de movimiento que la utilizada en este trabajo, donde el tubo

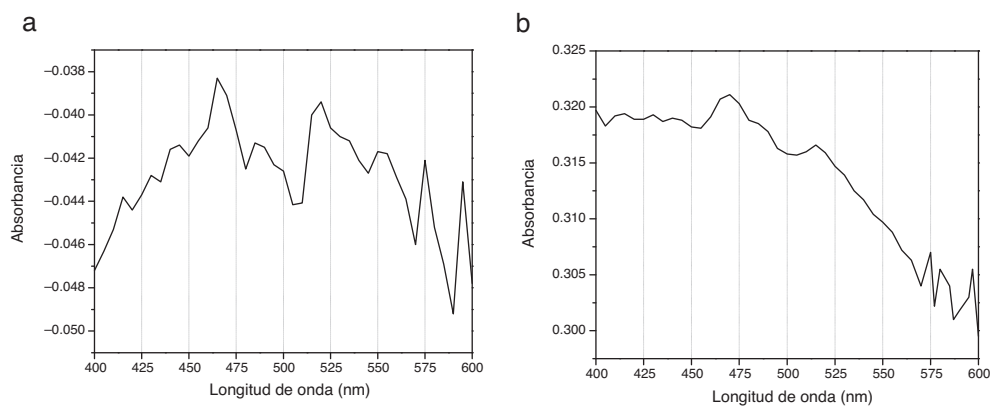


Figura 6 El espectrograma «a» corresponde al espectro de absorción de CHX al 2% no tratada y el espectrograma «b» corresponde al espectro de absorción de CHX al 2% activada con ultrasonido endodántico por 120 segundos.

epENDORF es de mayor tamaño y volumen. Por esta razón se podría esperar un mayor aumento de temperatura en los canales. Al llevar nuestros resultados a la clínica debiéramos esperar resultados equivalente pero aumentados, es decir, una mayor acidez y un mayor aumento de la temperatura, valores no descritos en la literatura. En próximos estudios se deben comprobar estos resultados, utilizando condiciones similares a las existentes en la clínica.

La hidrólisis de CHX produce PCA, reducida a temperatura ambiente, pero aumenta por calentamiento especialmente a pH alcalino²¹. Esta última se incrementó en 1 °C en promedio por el uso del USE. Esta variación de temperatura no produjo cambios en CHX que se tradujeran en un cambio visible de color o aparición de precipitado¹⁵. Esto corroborado con mediciones cuantitativas de PCA en las muestras de CHX activadas con USE, donde no se detectaron valores mayores de PCA de 0,0039 mg/ml, mínimo cuantificable por espectrofotometría visible. Estos resultados permiten establecer que el USE en la CHX al 2% no genera cambios de color ni precipitado coloreado, al utilizar parámetros similares de frecuencia (24.500 Hz) y tiempo de aplicación (30, 60, 90 y 120 seg) a los usados en la práctica clínica, lo que sugiere un comportamiento similar al interior de los canales radiculares.

Los efectos tóxicos de la PCA se presentan a concentraciones de 0,1 a 1,0 mg/ml, y los efectos inmunotóxicos a concentraciones de 0,01 a 0,001 mg/ml²². El valor mínimo cuantificable de PCA con la metodología usada es de 0,0039 mg/ml, concentración que produciría efectos inmunotóxicos, pero la cuantificación espectrofotométrica no arrojó valores medibles, por lo tanto no podemos conocer cuánto PCA se formó; en última instancia se puede sostener que la PCA formada por acción del ultrasonido sería menor a 0,0039 mg/ml bajo el límite de toxicidad. Para cuantificar la PCA formada se podría utilizar un método simple y rápido descrito en la literatura que permite cuantificar simultáneamente CHX y PCA mediante HPLC con detección UV. Este método presenta una buena resolución entre PCA y la CHX y tiempo de ejecución corto, permitiendo detectar PCA entre 0,05 a 10 µg/l²³.

Los espectros de absorción de la CHX al 2% y de las muestras tratadas con USE por 60 seg o más mostraron diferentes *peaks* de absorbancia y curvas espectrales. El espectro de absorción de la CHX al 2% no activada presenta su máxima absorbancia a los 460 nm, similar a la CHX al 2% activada por 30 seg y con curvas espectrales similares, evidenciando que la CHX al 2% después de 30 seg de activación con USE a 24.500 Hrtz no varía su estructura molecular (fig. 3).

Diferente es el resultado de las muestras activadas por 60 seg (fig. 4), 90 seg (fig. 5) y 120 seg (fig. 6), hay un corrimiento en el máximo de absorbancia (464 nm, 470 nm, 474 nm) y con curvas espectrales diferentes a la molécula de CHX al 2% sin activación; esto permite postular un cambio estructural de la CHX, ya que cualquier sustancia química sometida a interacción con otro compuesto, o al variar su temperatura o presión, se asocian los cambios en propiedades fisicoquímicas como indicadores de cambio molecular. Se puede inferir entonces que la estructura de la CHX sufre un cambio, evidenciable a causa de la activación con USE a partir de los 60 seg. Los resultados no permiten comprobar que la molécula generada por USE sea paracloroanilina; se sugiere que la molécula resultante de la activación por más

de 60 seg podría ser PCA, ya que presentan curvas espectrales y valores de absorbancia muy similares a los obtenidos con el espectro visible de la PCA estándar¹. Es importante cuantificar PCA donde pueda producirse y asegurar que sus niveles sean menores al límite aceptado (0,001 mg/ml), porque la PCA, como principal producto de la degradación de CHX¹⁴, puede tener efectos tóxicos, atendiendo a la recomendación actual para impurezas genotóxicas²⁴.

Conclusiones

El USE aumenta la temperatura y acidifica la solución de la CHX en todos los tiempos de aplicación.

No se detectó presencia de PCA por espectrofotometría visible.

Muestras de CHX activadas por USE por 60 seg o más presentan espectros de absorción diferentes a las muestras sin activar.

Diferencias en los espectros de absorción entre CHX activadas con USE y con CHX 2% sin activar indicarían degradación de la CHX y posible aparición de PCA.

Financiación

Publicación financiada por el proyecto FIOUCH 13-015, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no presentar conflicto de intereses de ningún tipo.

Bibliografía

1. Basrani B, Ghanem A, Tjäderhane L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. *J Endod.* 2004;30:413–7.
2. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Texeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod.* 2001;27:452–5.
3. Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;99:231–52.
4. Estrela C, Holland R, Bernabe PFE, Souza V, Estrela CRA. Antimicrobial potential of medicaments used in healing process in dogs' teeth with apical periodontitis. *Braz Dent J.* 2004;15:181–5.
5. Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JAP, Estrela CRA. Antibacterial efficacy of intracanal medicaments on bacterial biofilm: A critical review. *J Appl Oral Sci.* 2009;17:1–7.
6. Chong BS, Pitt Ford TR. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J.* 1992;25:97–106.
7. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J.* 2009;42:288–302.
8. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006;32:389–98.
9. Havlíková L, Matysová L, Nováková L, Hájková R, Solich P. Determination of chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;43:1169–73.
10. Denton GW. Chlorhexidine. En: Block SS, editor. *Disinfection, sterilization and preservation.* 4th ed Philadelphia: Lea & Febiger; 1991. p. 274–89.

11. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am.* 2010;54:291–312.
12. Buck RA, Cai J, Eleazer PD, Staat RH, Hurst HE. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. *J Endod.* 2001;27:325–7.
13. Usui K, Hishinuma T, Yamaguchi H, Tachiiri N, Goto J. Determination of chlorhexidine (CHD) and nonylphenoethoxylates (NPEOn) using LC-ESI-MS method and application to hemolyzed blood. *J Chromatogr B.* 2006;831:105–9.
14. Basrani BR, Manek S, Sodhi RNS, Filler E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod.* 2007;33:966–9.
15. World Health Organization. International Agency for Research on cancer: IARC monography on the evaluation of carcinogenic risks to human. Lyon, France. 2006;86:1–25.
16. De Paolis G, Vicenti V, Prencipe M, Milana V, Plotino G. Ultrasonics in endodontic surgery: A review of the literature. *Ann Stomatol.* 2010;1:6–10.
17. Russell AD, Day MJ. Antibacterial activity of clorhexidine. *J Hosp Infect.* 1993;25:229–38.
18. Beales N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. *Compr Rev Food Sci Food Safety.* 2004;3:1–20.
19. Martin H. Ultrasonic disinfections of the root canal. *Oral Surg.* 1976;42:92–9.
20. Cunningham W, Balekjian A. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hipoclorite endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1980;49:175–7.
21. Block SS. Disinfection, sterilization and preservation. Chapter 16. 4th ed. PA: Lea and Febriger; 1991. p. 274.
22. Barbin LE, Saquy PC, Guedes DFC, Sousa-Neto MD, Estrela C, Pecora JD. Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. *J Endod.* 2008;34:1508–14.
23. Nicolay A, Wolff E, Vergnes M, Kalovstian J, Portugal H. Rapid HPLC method for determination of parachlorhexidine in chlorhexidine antiseptic agent in mouthrinses, ophthalmic and skin solution. *Am J Anal Chem.* 2011;2:422–8.
24. European Medicines Agency. Guideline on the limits of genotoxic impurities, EMEA/CHMP/QWP/251344/2006; 2006. p. 1-8.